

**LIUKOISEN UROKINAASITYYPPISEN
PLASMINOGEENIAKTIVAATTORIN RESEPTORIN (SUPAR)
PLASMAPITOISUUS ON YHTEYDESSÄ PUUMALA-VIRUKSEN
AIHEUTTAMAN AKUUTIN MYYRÄKUUMEEN VAIKEUSASTEeseen**

Niina Mäenpää
Syventävien opintojen kirjallinen työ
Tampereen yliopisto
Lääketieteen yksikkö
Klininen mikrobiologia
Joulukuu 2015

Tampereen yliopisto
Lääketieteen yksikkö, kliininen mikrobiologia

NIINA MÄENPÄÄ: LIUKOISEN UROKINAASITYYPPISEN PLASMINOGEENIAKTIVAATTORIN RESEPTORIN (SUPAR) PLASMAPITOISUUS ON YHTEYDESSÄ PUUMALA-VIRUKSEN AIHEUTTAMAN AKUUTIN MYRRÄKUUMEEN VAIKEUSASTEeseen

Kirjallinen työ, 16 sivua

Ohjaaja: Dosentti, LT Janne Aittoniemi, Fimlab laboratoriot Oy

Joulukuu 2015

Avainsanat: suPAR, hantavirus, Puumala-virus, patogeneesi

Urokinaasityyppinen plasminogeeniaktivaattorin reseptori (urokinase type plasminogen activator receptor, uPAR) on solukalvon glykoproteiini, jota esiintyy erityisesti immunologisen järjestelmän solujen pinnalla. Sen liukoisen muodon (soluble urokinase type plasminogen activator receptor, suPAR) pitoisuus plasmassa nousee mm. inflammaation yhteydessä. suPAR:lla on lisäksi monenlaisia tehtäviä liittyen mm. solujen adheesioon, migraatioon ja kemotaksikseen.

Myrräkuume on Puumala-hantaviruksen aiheuttama, usein lievä, munuaisoireinen verenvuotokuume. Taudinkuvaan kuuluu mm. trombosytopenia, leukosytoosi, anemia, kohonnut CRP- ja kreatiinipitoisuus sekä protein- ja hematuria. Myrräkuumeen patogeneesi on edelleen osittain epäselvä, mutta hantavirusten tiedetään käyttävän solukalvojen $\beta 3$ -integriinejä päästäkseen solukalvojen läpi.

Tämän prospektiivisen kohorttitutkimuksen tavoitteena oli arvioida suPAR-pitoisuuden yhteyttä akuutin myrräkuumeen kliiniseen vaikeusasteeseen sekä suPAR:n mahdollista osuutta myrräkuumeen patogeneesissa.

Tutkimuskohortti koostui 97 potilaasta, joilla oli serologisesti varmistettu myrräkuume. Potilasmateriaali kerättiin vuosina 2001 – 2009 Tampereen yliopistollisessa sairaalassa. suPAR-pitoisuudet mitattiin kahdesti akuutissa vaiheessa sekä kerran toipumisvaiheessa. suPAR pitoisuudet määritettiin EDTA-plasmanäytteistä kaupallisella ELISA-menetelmällä (suPARnostic® Standard Kit; Virogates A/S, Birkerød, Denmark).

suPAR-pitoisuudet olivat selkeästi korkeammat akuutissa vaiheessa kuin toipumisvaiheessa (8,7 ng/ml vs. 4,7 ng/ml, $p < 0,001$). Kun suPAR-pitoisuuksia verrattiin myrräkuumeen yleistä kliinistä vaikeusastetta osoittaviin parametreihin, positiivinen korrelaatio havaittiin leukosyyttilukumäärän ($r = 0,475$, $p < 0,001$), kreatiinipitoisuuden ($r = 0,378$, $p < 0,001$), sairaalahoidon aikaisen painon muutoksen ($r = 0,352$, $p < 0,001$) sekä sairaalahoidon pituuden ($r = 0,406$, $p < 0,001$) kesken. Negatiivinen korrelaatio vallitsi suPAR-pitoisuuden ja trombosyyttilukumäärän ($r = -0,325$, $p < 0,001$) sekä hematokriitin ($r = -0,369$, $p < 0,01$) välillä. Tulokset osoittivat, että suPAR-pitoisuus nousee merkittävästi myrräkuumeen akuutin vaiheen aikana ja korkeampi pitoisuus ennustaa vaikeampaa taudinkuvaa. Koska suPAR-pitoisuudet nousevat merkittävästi myrräkuumeinfektion aikana, ja sekä suPAR:n että hantavirusten tiedetään sitoutuvan integriineihin, suPAR on mahdollinen myötävaikuttava tekijä myös taudin patogeneettisessä mekanismissa.

SISÄLLYS

1 Abstract	1
2 Introduction	1
3 Materials and methods	2
3.1 Ethics statement	2
3.2 Patients	2
3.3 Study protocol	2
3.4 Methods	2
3.5 Statistical analysis	2
4 Results	2
5 Discussion	3
6 Conclusions	5
7 Acknowledgments	5
8 Author Contributions	5
9 References	5
10 Kirjallisuuskatsaus	7
10.1 Mikä on suPAR?	7
10.2 suPAR sairauksien patogeneesissa	8
10.3 suPAR-pitoisuus ennusteellisena tekijänä infektioissa	8
10.3.1 suPAR ennustetekijänä sepsiksessä	8
10.3.2 suPAR ennustetekijänä tuberkuloosi-infektiossa	11
10.3.3 suPAR ennustetekijänä virusinfektioissa	11
10.4 Yhteenveto	13
10.5 Lähteet	15

Plasma Levels of Soluble Urokinase-Type Plasminogen Activator Receptor Associate with the Clinical Severity of Acute Puumala Hantavirus Infection

Tuula K. Outinen^{1,2*}, Laura Tervo¹, Satu Mäkelä^{1,2}, Reetta Huttunen^{1,2}, Niina Mäenpää^{2,3}, Heini Huhtala⁴, Antti Vaheri⁵, Jukka Mustonen^{1,2}, Janne Aittoniemi³

1 Department of Internal Medicine, Tampere University Hospital, Tampere, Finland, **2** School of Medicine, University of Tampere, Tampere, Finland, **3** Department of Clinical Microbiology, Fimlab Laboratories, Tampere, Finland, **4** School of Health Sciences, University of Tampere, Tampere, Finland, **5** Department of Virology, Haartman Institute, University of Helsinki, Helsinki, Finland

Abstract

Objectives: Urokinase-type plasminogen activator receptor is a multifunctional glycoprotein, the expression of which is increased during inflammation. It is known to bind to β_3 -integrins, which are elementary for the cellular entry of hantaviruses. Plasma soluble form of the receptor (suPAR) levels were evaluated as a predictor of severe Puumala hantavirus (PUUV) infection and as a possible factor involved in the pathogenesis of the disease.

Design: A single-centre prospective cohort study.

Subjects and Methods: Plasma suPAR levels were measured twice during the acute phase and once during the convalescence in 97 patients with serologically confirmed acute PUUV infection using a commercial enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA).

Results: The plasma suPAR levels were significantly higher during the acute phase compared to the control values after the hospitalization (median 8.7 ng/ml, range 4.0–18.2 ng/ml vs. median 4.7 ng/ml, range 2.4–12.2 ng/ml, $P < 0.001$). The maximum suPAR levels correlated with several variables reflecting the severity of the disease. There was a positive correlation with maximum leukocyte count ($r = 0.475$, $p < 0.001$), maximum plasma creatinine concentration ($r = 0.378$, $p < 0.001$), change in weight during the hospitalization ($r = 0.406$, $p < 0.001$) and the length of hospitalization ($r = 0.325$, $p = 0.001$), and an inverse correlation with minimum platelet count ($r = -0.325$, $p = 0.001$) and minimum hematocrit ($r = -0.369$, $p < 0.001$).

Conclusion: Plasma suPAR values are markedly increased during acute PUUV infection and associate with the severity of the disease. The overexpression of suPAR possibly activates β_3 -integrin in PUUV infection, and thus might be involved in the pathogenesis of the disease.

Citation: Outinen TK, Tervo L, Mäkelä S, Huttunen R, Mäenpää N, et al. (2013) Plasma Levels of Soluble Urokinase-Type Plasminogen Activator Receptor Associate with the Clinical Severity of Acute Puumala Hantavirus Infection. PLoS ONE 8(8): e71335. doi:10.1371/journal.pone.0071335

Editor: Niklas K. Björkström, Karolinska Institutet, Sweden

Received: May 25, 2013; **Accepted:** July 2, 2013; **Published:** August 21, 2013

Copyright: © 2013 Outinen et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Funding: This study was financially supported by the Competitive State Research Financing of the Expert Responsibility Area of Tampere University Hospital (9P031, Fimlab X50000), European Commission Project "Diagnosis and control of rodent-borne viral zoonoses in Europe" (QLK2-CT-2002-01358), and by grants from the Sigrid Jusélius Foundation, the Finnish Kidney Foundation and the Orion-Farmos Research Foundation. The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Competing Interests: The authors have the following interests: Niina Mäenpää and Janne Aittoniemi are employed by Fimlab Laboratories. There are no patents, products in development or marketed products to declare. This does not alter their adherence to all the PLOS ONE policies on sharing data and materials, as detailed online in the guide for authors.

* E-mail: tuula.outinen@uta.fi

Introduction

Hantaviruses cause two clinical syndromes in humans, hemorrhagic fever with renal syndrome (HFRS) in Eurasia and hantavirus cardiopulmonary syndrome (HCPS) in the Americas [1,2]. Puumala hantavirus (PUUV), carried by the bank vole, causes a mild HFRS called nephropathia epidemica (NE) [1,2]. NE is prevalent in Finland, elsewhere in Scandinavia, European Russia, and many parts of Central-Western Europe [1,2]. In Europe, PUUV causes most HFRS cases, and in Finland, 1,000–

3,000 serological PUUV infection diagnoses are made annually (<http://www3.ktl.fi>) [3].

The clinical severity of NE varies from subclinical disease to fatal cases. However, the mortality rate is low, about 0.1% [4]. Typical symptoms are sudden high fever, headache, abdominal pain, nausea, backache, and visual disturbances, while serious hemorrhagic manifestations are uncommon [5–8]. Signs of renal involvement are proteinuria, hematuria, and oliguria, the latter being followed by polyuria [5–8]. During the oliguric phase, about 5% of hospitalized patients need transiently hemodialysis treat-

ment [6–8]. Usual laboratory findings are leukocytosis, thrombocytopenia, anemia, elevation of plasma C-reactive protein (CRP) and creatinine levels, as well as proteinuria and hematuria [6,7]. Radiological pulmonary manifestations have been detected in about one-third of hospitalized patients [9,10].

The pathogenesis of NE is incompletely understood. An important feature in hantavirus infections is universally increased capillary permeability leading to vascular leakage, but the mechanisms behind this phenomenon are unclear [11–13]. The endothelium of the small vessels in various organs is the primary target of hantavirus infection and β_3 -integrins mediate the cellular entry of pathogenic hantaviruses [14,15]. It has been suggested that immunological factors rather than direct cytotoxicity are essential in the pathogenesis, since no obvious damage to the endothelial cells is seen [11–13].

Several biomarkers have been shown to serve as indicators of the severity of PUUV infection. The plasma levels of interleukin (IL)-6, pentraxin-3 (PTX3), and indoleamine 2,3 dioxygenase (IDO), all elements of the innate immunity, as well as of cellular damage -reflecting cell-free DNA (cf-DNA) predict the outcome of PUUV infection [16–19]. So does the urine levels of the transcription factor necessary for the generation of type 2 T-cells, GATA-3 [20]. On the contrary, although plasma CRP is elevated in almost all of the patients with PUUV infection, high CRP level does not indicate a more severe disease [19].

Urokinase-type plasminogen activator receptor (uPAR) is a multifunctional glycoprotein, the expression of which is increased during infection and inflammation [21,22]. It is expressed on several different cell types, including monocytes, activated T-lymphocytes, macrophages, neutrophils, endothelial cells, and kidney podocytes [21,22]. uPAR interacts with several molecules mediating immune system signals and promotes the migration and adhesion of leukocytes by binding to β -integrins [21,22]. Cell-cell contact has been shown to enhance the release of the soluble form of the receptor (suPAR) by endothelial cells, indicating a regulatory role of suPAR in cell adhesion [23]. The levels of plasma suPAR are considered to represent the degree of immunoactivation [22]. Plasma suPAR has been found to be increased as well as predict disease severity in various conditions, e.g. autoimmune diseases, cancer, malaria, tuberculosis, sepsis, and human immunodeficiency virus (HIV) infection [22,24–30].

In the present study, our aim was to evaluate the association of suPAR with the severity of acute PUUV infection and also assess the possible role of suPAR in the pathogenesis of the disease.

Materials and Methods

Ethics statement

All subjects gave a written informed consent before participation and the study was conducted according to the principles expressed in the Declaration of Helsinki and approved by the Ethics Committee of Tampere University Hospital.

Patients

The study cohort consisted of 97 prospectively collected adult patients with acute NE. The diagnosis of acute PUUV infection was serologically confirmed in all cases [31]. The patients were treated at the Tampere University Hospital (Tampere, Finland) from November 2001 to February 2009. The median patient age was 41 (range 22–77) years, and 63 (65%) were males. Part of the patients (10–83 patients of the present cohort depending on the previous study) has participated also in our previous studies [16–20,32–35]. All the patients treated during November 2001 and

February 2009 were included in the study, if there was plasma left for the analyses of suPAR concentration.

Study protocol

All 97 patients were examined during the acute phase of NE. A detailed past and current medical history was obtained, and a careful physical examination was performed. Blood samples were collected between 7:30–9:30 in the morning for two consecutive weekdays after hospitalization for the analysis of plasma suPAR. Blood samples for the determination of plasma cf-DNA, PTX3, IL-6, CRP, creatinine, and serum kynurenine (Kyn) and tryptophan (Trp) levels, as well as the blood cell counts were collected for up to five consecutive days. Other blood samples were taken according to the clinical needs of the patient.

The highest and the lowest values of the various variables measured during hospitalization for each patient were designated as the maximum and minimum values.

Eighty-four (87%) of the 97 patients were also studied at the out-patient clinic 1–4 weeks after the hospital period. The plasma samples taken at the out-patient clinic after the hospital treatment were regarded as control samples.

Methods

EDTA-treated plasma samples for suPAR determination were collected from patients during hospitalization and at the out-patient clinic and stored at -70°C until required for analysis. Plasma suPAR levels were determined using a commercial enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) (suPARnostic® Standard kit; ViroGates A/S, Birkerød, Denmark) according to the manufacturer's instructions.

Plasma CRP and creatinine levels were analyzed using Cobas Integra analyzer (F. Hoffman-La Roche Ltd, Basel, Switzerland). Blood cell count was completed by hematological cell counters by Bayer. Plasma IL-6 concentrations were determined as previously described [36]. IDO level can be measured by determining the ratio of Kyn to Trp in serum [37] by reverse-phase high performance liquid chromatography (HPLC) as previously described [38]. The Kyn/Trp ratio was calculated by relating concentrations of Kyn to Trp. Plasma PTX3 determinations were performed by using a commercially available human pentraxin-3 immunoassay (Quantikine, R&D Systems, Inc., Minneapolis, MN), following the manufacturer's instructions. Plasma cf-DNA levels were determined as previously described [16]. Plasma IL-6, PTX3, and cf-DNA, as well as serum Kyn and Trp concentrations were measured afterwards from frozen samples.

Statistical Analyses

In order to describe the data, medians and ranges were given for continuous variables and numbers and percentages for categorical variables. Groups were compared using the Mann-Whitney *U*-test. Correlations were calculated by the Spearman's rank correlation test. Wilcoxon's test was used to compare two related samples. All tests were two-sided, and statistically significant *P*-values are given. All analyses were made with the SPSS (version 20) statistical software package (IBM, Chicago, IL).

Results

The clinical characteristics of the patients are shown in Table 1 and the laboratory variables measured during hospitalization in Table 2. None of the patients was in clinical shock at the time of admission and five patients (5%) needed hemodialysis treatment during the hospital stay. No deaths occurred.

Table 1. Clinical data of 97 patients with acute Puumala hantavirus infection.

	Median	Range
Age (years)	41	22–77
Duration of fever before hospital admission (days)	4	1–15
Total duration of fever (days)	7	2–19
Length of hospital stay (days)	6	2–15
Change in weight during hospitalization (kg)	2.1	0–12.0
Minimum urinary output (ml/day)	1400	50–5800

doi:10.1371/journal.pone.0071335.t001

The maximum plasma suPAR levels taken during acute NE were significantly elevated compared to the control values taken after the hospitalization period (median 8.7 ng/ml, range 4.0–18.2 ng/ml *vs.* median 4.7 ng/ml, range 2.4–12.2 ng/ml, $P < 0.001$). The control values were taken median 22 (range 15–41) days after the onset of fever. Figure 1 shows the suPAR levels in relation to the duration of the disease, i.e. the onset of fever.

The maximum plasma suPAR levels correlated with several parameters reflecting the severity of acute PUUV infection (Table 3). There was a positive correlation of suPAR with the length of hospital stay and with the change in weight during hospitalization, which reflects fluid retention during the oliguric phase. Plasma suPAR also correlated positively with plasma creatinine, CRP, PTX3, IL-6, IDO, and cf-DNA levels, as well as with the blood leukocyte counts. An inverse correlation was detected between maximum plasma suPAR level and minimum urinary output as well as between maximum suPAR and minimum platelet levels. There was no correlation between maximum suPAR and age (Table 3).

The maximum suPAR level was higher in patients who required dialysis treatment during hospitalization compared to patients who managed without dialysis (Table 4). Patients who stayed longest (>6 days) at the hospital had also higher suPAR levels than patients with shorter hospitalizations. Furthermore, patients with maximum creatinine level $>200 \mu\text{mol/l}$ or maximum blood leukocyte count $>10 \times 10^9/\text{l}$ had higher suPAR levels compared to patients with lower creatinine or leukocyte values. Significant thrombocytopenia (platelet count $<50 \times 10^9/\text{l}$) associated also with higher suPAR levels. There was no difference in suPAR levels between men and women (Table 4).

Discussion

In the present study, plasma suPAR levels in a hantavirus infection are reported to our knowledge for the first time. The data presented here show that plasma suPAR levels are clearly elevated during acute PUUV infection. The suPAR values measured during the acute phase were markedly higher than the control values measured after the hospitalization and correspond with the levels previously reported in bacteremic patients [25]. Furthermore, the convalescence phase levels correspond to the levels previously measured in the general population [39]. The maximum plasma suPAR levels also correlated with several PUUV infection severity reflecting variables in the present study. suPAR correlated positively with the length of hospital stay, the change in body weight during hospitalization, plasma creatinine, and the leukocyte counts. An inverse correlation was detected by

Table 2. Laboratory data of 97 patients with acute Puumala hantavirus infection.

	Median	Range
suPAR max (ng/ml)	8.7	4.0–18.2
Creatinine max ($\mu\text{mol/l}$)	175	51–1499
Platelets min ($10^9/\text{l}$)	61	9–187
Hematocrit min	0.36	0.25–0.44
Leukocytes max ($10^9/\text{l}$)	10.4	3.9–31.2
CRP max (mg/l)	84.6	15.9–269.2
IL-6 max (pg/ml) (n = 29)	11.8	2.6–44.8
PTX3 max (ng/ml) (n = 42)	42.9	3.9–1085.5
IDO max ($\mu\text{mol}/\text{mmol}$) (n = 83)	202.2	47.7–3679.2
cf-DNA ($\mu\text{mol}/\text{ml}$) (n = 42)	1.35	1.04–3.29

Min = minimum, Max = maximum, suPAR = soluble urokinase-type plasminogen activator receptor, CRP = plasma C-reactive protein, IL-6 = plasma interleukin-6, PTX3 = plasma pentraxin-3, IDO = serum indoleamin 2,3-dioxygenase, cf-DNA = plasma cell-free DNA.

doi:10.1371/journal.pone.0071335.t002

suPAR with minimum urinary output and minimum platelet levels.

There was also a positive correlation between suPAR and the biomarkers previously shown to predict the outcome of PUUV infection, PTX3, IL-6, IDO, and cf-DNA [16–19]. PTX3, IL-6, and IDO not only reflect the severity of PUUV induced NE, but also the activation of the immune system, and are partly expressed by the same type of cells as suPAR in response to inflammatory signals. Furthermore, cf-DNA reflects the degree of cellular damage. CRP, on the other hand, does not predict the outcome of PUUV infection [19]. In the present study, however, suPAR correlated also with CRP in PUUV-infected patients. This probably is explained by CRP reflecting the activation of the immune system, although it does not reflect the overall severity of the disease in PUUV infection.

Systemic suPAR levels are considered to reflect the degree of immunoactivation of the individual. This is corroborated by numerous studies showing suPAR levels to be increased as well in cancer as in various inflammatory and infectious diseases [22]. Furthermore, high suPAR concentrations are predictive of outcome and mortality in these conditions [22]. Previous studies on patients with infectious diseases have demonstrated that suPAR can predict disease severity and case fatality in malaria, tuberculosis, sepsis, bacterial meningitis, and some viral infections [24–27,29,30,40–44].

Previously, suPAR has been studied only in a few viral infections. However, in HIV infection, several studies show that suPAR is a strong predictor of immunologic failure and mortality [28,41]. In addition, the suPAR levels decrease with effective antiretroviral therapy [40]. In patients with Crimean-Congo hemorrhagic fever, suPAR is elevated and also predictive for mortality [42]. Systemic suPAR levels also predict the progression of liver fibrosis to cirrhosis in patients with chronic hepatitis C [45,46]. Furthermore, elevated suPAR levels have been found in the cerebrospinal fluid of patients with viral meningitis [44]. Here, we demonstrate that suPAR is elevated and associates with severity of the disease in PUUV-induced hantavirus infection.

The exact pathogenetic mechanisms in hantavirus infection are currently still unclear. Pathological changes are marked by increased capillary permeability in the affected organs, which also explains many signs and symptoms in these infections [11–13].

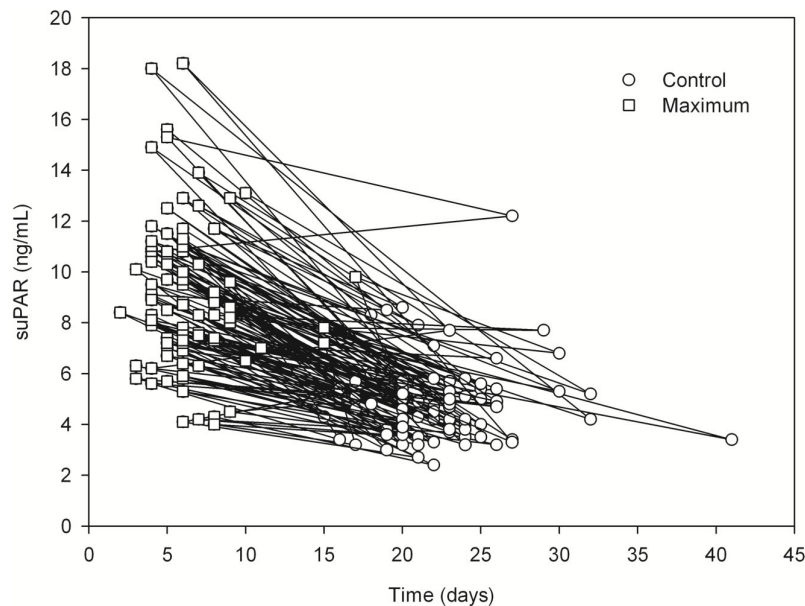


Figure 1. Line chart showing soluble urokinase-type plasminogen activator receptor (suPAR) maximum (median 8.7 ng/ml, range 4.0–18.2 ng/ml) and convalescence phase concentrations (median 4.7 ng/ml, range 2.4–12.2 ng/ml) in relation to the onset of fever (day 0) in 97 patients with Puumala hantavirus infection (P-value for the difference <0.001). Short title: Line chart showing suPAR maximum and convalescence concentrations in relation to the onset of fever.
doi:10.1371/journal.pone.0071335.g001

The endothelium of the small vessels in various organs is the primary target in hantavirus infection, and the cellular entry of pathogenic hantaviruses is mediated by β_3 -integrins [11,13–15]. Integrins are heterodimeric surface receptors on endothelial cells and platelets, mediating cell-to-cell adhesion, cell migration, extracellular matrix protein recognition, and platelet aggregation. β_3 -integrins have an important role in regulating vascular

integrity, endothelial cell permeability, and platelet functions [47]. Pathogenic hantaviruses probably interfere with these

Table 3. The correlations of maximum plasma suPAR levels with clinical and laboratory variables reflecting the severity of the infection in 97 patients with acute Puumala hantavirus infection.

	R	P-value
Length of hospitalization	0.325	0.001
Change in weight during hospitalization	0.406	<0.001
Urinary output min	−0.332	0.002
Creatinine max	0.378	<0.001
Platelets min	−0.325	0.001
Hematocrit min	−0.369	<0.001
Leukocytes max	0.475	<0.001
CRP max	0.298	0.003
PTX3 max	0.425	0.005
IL-6 max	0.621	<0.001
IDO max	0.557	<0.001
cf-DNA max	0.363	0.018

Min = minimum, Max = maximum, CRP = C-reactive protein, PTX3 = pentraxin-3, IL-6 = interleukin-6, IDO = indoleamine 2,3-dioxygenase, cf-DNA = cell-free DNA.
doi:10.1371/journal.pone.0071335.t003

Table 4. Maximum plasma suPAR levels in different patient groups in 97 patients with Puumala virus infection.

	suPAR levels		P-value
	Median	Range	
Sex			0.841
Male	8.6	4.2–18.2	
Female	8.8	4.0–15.3	
Dialysis			0.038
Yes	10.8	8.6–18.0	
No	8.4	4.0–18.2	
Hospital stay			0.007
>6 days	9.2	6.5–18.2	
≤6 days	8.3	4.0–13.1	
Minimum platelet level			0.019
<50 × 10 ⁹ /l	9.7	5.7–18.2	
≥50 × 10 ⁹ /l	8.2	4.0–15.6	
Maximum leukocyte count			<0.001
>10 × 10 ⁹ /l	9.2	5.7–18.2	
≤10 × 10 ⁹ /l	7.5	4.0–13.1	
Maximum creatinine			0.001
>200 μmol/l	9.4	6.5–18.2	
≤200 μmol/l	8.0	4.0–15.6	

doi:10.1371/journal.pone.0071335.t004

functions, hence increasing endothelial permeability [47]. uPAR, in turn, interacts with integrins, including β_3 -integrins, and is believed to regulate their activation degree by altering their adhesive properties and signaling capacity [21,22].

In this study, we found that plasma suPAR is markedly elevated in patients with PUUV-infection. Moreover, the higher the suPAR level is, the severer is also the disease. Taken into account the role of β_3 -integrins in the course of hantavirus infection, and on the other hand, the interactions of (s)uPAR and integrins, our finding presents as interesting. It brings up the possibility that increased suPAR is involved in the pathogenesis of PUUV infection by activating β_3 -integrins.

Conclusions

The plasma level of suPAR is elevated in acute PUUV infection and associates with the severity of the disease. Therefore, plasma suPAR determinations may offer a potential

diagnostic tool for assessing the severity and outcome of the disease. In addition, it is possible that circulating suPAR is involved in the pathogenesis of PUUV-induced hantavirus infection by activating β_3 -integrins. However, future studies are warranted to verify this assumption.

Acknowledgments

The skilful technical assistance of Ms Katriina Ylinikkilä and Ms Mirja Ikonen is greatly appreciated.

Author Contributions

Conceived and designed the experiments: TKO LT SM RH NM HH AV JM JA. Performed the experiments: NM JA. Analyzed the data: TKO SM. Contributed reagents/materials/analysis tools: JA. Wrote the paper: TKO. Produced the figure: HH. Drafted the article or revised it critically: TKO LT SM RH NM HH AV JM JA. Approved the version to be published: TKO LT SM RH NM HH AV JM JA.

References

1. Vapalahti O, Mustonen J, Lundkvist Å, Henttonen H, Plyusnin A, et al. (2003) Hantavirus infections in Europe. *Lancet Infect Dis* 3: 653–661.
2. Vaheri A, Henttonen H, Voutilainen L, Mustonen J, Sironen T, et al. (2013) Hantavirus infections in Europe and their impact on public health. *Rev Med Virol* 23: 35–49.
3. Heyman P, Vaheri A (2008) Situation of hantavirus infections and haemorrhagic fever with renal syndrome in European countries as of December 2006. *Euro Surveill* 13.
4. Makary P, Kanerva M, Ollgren J, Virtanen MJ, Vapalahti O, et al. (2010) Disease burden of Puumala virus infections, 1995–2008. *Epidemiol Infect* 138: 1484–1492.
5. Lahdevirta J (1971) Nephropathia epidemica in Finland. A clinical histological and epidemiological study. *Ann Clin Res* 3: 1–54.
6. Mustonen J, Brummer-Korvenkontio M, Hedman K, Pasternack A, Pietilä K, et al. (1994) Nephropathia epidemica in Finland: a retrospective study of 126 cases. *Scand J Infect Dis* 26: 7–13.
7. Settergren B, Juto P, Trollfors B, Wadell G, Norrby SR (1989) Clinical characteristics of nephropathia epidemica in Sweden: prospective study of 74 cases. *Rev Infect Dis* 11: 921–927.
8. Braun N, Haap M, Overkamp D, Kimmel M, Alschner MD, et al. (2010) Characterization and outcome following Puumala virus infection: a retrospective analysis of 75 cases. *Nephrol Dial Transplant* 25: 2997–3003.
9. Kanerva M, Paakkala A, Mustonen J, Paakkala T, Lahtela J, et al. (1996) Pulmonary involvement in nephropathia epidemica: radiological findings and their clinical correlations. *Clin Nephrol* 46: 369–378.
10. Paakkala A, Mustonen J (2007) Radiological findings and their clinical correlations in nephropathia epidemica. *Acta Radiol* 48: 345–350.
11. Zaki SR, Greer PW, Coffield LM, Goldsmith CS, Nolte KB, et al. (1995) Hantavirus pulmonary syndrome. Pathogenesis of an emerging infectious disease. *Am J Pathol* 146: 552–579.
12. Cosgriff TM (1991) Mechanisms of disease in Hantavirus infection: pathophysiology of hemorrhagic fever with renal syndrome. *Rev Infect Dis* 13: 97–107.
13. Kanerva M, Mustonen J, Vaheri A (1998) Pathogenesis of Puumala and other hantavirus infections. *Rev Med Virol* 8: 67–86.
14. Gavrilovskaya IN, Shepley M, Shaw R, Ginsberg MH, Mackow ER (1998) beta3 Integrins mediate the cellular entry of hantaviruses that cause respiratory failure. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95: 7074–7079.
15. Gavrilovskaya IN, Brown EJ, Ginsberg MH, Mackow ER (1999) Cellular entry of hantaviruses which cause hemorrhagic fever with renal syndrome is mediated by beta3 integrins. *J Virol* 73: 3951–3959.
16. Outinen TK, Kuparinen T, Jylhävä J, Leppänen S, Mustonen J, et al. (2012) Plasma cell-free DNA levels are elevated in acute Puumala hantavirus infection. *PLoS One* 7: e31455.
17. Outinen TK, Mäkelä S, Huhtala H, Hurme M, Meri S, et al. (2012) High pentraxin-3 plasma levels associate with thrombocytopenia in acute Puumala hantavirus-induced nephropathia epidemica. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 31: 957–963.
18. Outinen TK, Mäkelä SM, Ala-Houhala IO, Huhtala HS, Hurme M, et al. (2011) High activity of indoleamine 2,3-dioxygenase is associated with renal insufficiency in Puumala hantavirus induced nephropathia epidemica. *J Med Virol* 83: 731–737.
19. Outinen TK, Mäkelä SM, Ala-Houhala IO, Huhtala HS, Hurme M, et al. (2010) The severity of Puumala hantavirus induced nephropathia epidemica can be better evaluated using plasma interleukin-6 than C-reactive protein determinations. *BMC Infect Dis* 10: 132.
20. Libraty DH, Mäkelä S, Vlk J, Hurme M, Vaheri A, et al. (2012) The Degree of Leukocytosis and Urine GATA-3 mRNA Levels Are Risk Factors for Severe Acute Kidney Injury in Puumala Virus Nephropathia Epidemica. *PLoS One* 7: e35402.
21. Ossowski L, Aguirre-Ghiso JA (2000) Urokinase receptor and integrin partnership: coordination of signaling for cell adhesion, migration and growth. *Curr Opin Cell Biol* 12: 613–620.
22. Thuno M, Macho B, Eugen-Olsen J (2009) suPAR: the molecular crystal ball. *Dis Markers* 27: 157–172.
23. Mustjoki S, Sidenius N, Vaheri A (2000) Enhanced release of soluble urokinase receptor by endothelial cells in contact with peripheral blood cells. *FEBS Lett* 486: 237–242.
24. Eugen-Olsen J, Gustafson P, Sidenius N, Fischer TK, Parner J, et al. (2002) The serum level of soluble urokinase receptor is elevated in tuberculosis patients and predicts mortality during treatment: a community study from Guinea-Bissau. *Int J Tuberc Lung Dis* 6: 686–692.
25. Huttunen R, Syrjänen J, Vuento R, Hurme M, Huhtala H, et al. (2011) Plasma level of soluble urokinase-type plasminogen activator receptor as a predictor of disease severity and case fatality in patients with bacteraemia: a prospective cohort study. *J Intern Med* 270: 32–40.
26. Koch A, Voigt S, Kruschinski C, Sanson E, Duckers H, et al. (2011) Circulating soluble urokinase plasminogen activator receptor is stably elevated during the first week of treatment in the intensive care unit and predicts mortality in critically ill patients. *Crit Care* 15: R63.
27. Molkänen T, Ruotsalainen E, Thorball CW, Järvinen A (2011) Elevated soluble urokinase plasminogen activator receptor (suPAR) predicts mortality in *Staphylococcus aureus* bacteremia. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 30: 1417–1424.
28. Sidenius N, Sier CF, Ullum H, Pedersen BK, Lepri AC, et al. (2000) Serum level of soluble urokinase-type plasminogen activator receptor is a strong and independent predictor of survival in human immunodeficiency virus infection. *Blood* 96: 4091–4095.
29. Ostrowski SR, Ullum H, Goka BQ, Hoyer-Hansen G, Obeng-Adjei G, et al. (2005) Plasma concentrations of soluble urokinase-type plasminogen activator receptor are increased in patients with malaria and are associated with a poor clinical or a fatal outcome. *J Infect Dis* 191: 1331–1341.
30. Uusitalo-Seppälä R, Huttunen R, Tarkka M, Aittoniemi J, Koskinen P, et al. (2012) Soluble urokinase-type plasminogen activator receptor in patients with suspected infection in the emergency room: a prospective cohort study. *J Intern Med* 272: 247–256.
31. Vapalahti O, Lundkvist Å, Kallio-Kokko H, Pauku K, Julkunen I, et al. (1996) Antigenic properties and diagnostic potential of Puumala virus nucleocapsid protein expressed in insect cells. *J Clin Microbiol* 34: 119–125.
32. Laine O, Joutsu-Korhonen L, Mäkelä S, Mikkelsen J, Pessi T, et al. (2012) Polymorphisms of PAI-1 and platelet GP Ia may associate with impairment of renal function and thrombocytopenia in Puumala hantavirus infection. *Thromb Res* 129: 611–615.
33. Laine O, Mäkelä S, Mustonen J, Helminen M, Vaheri A, et al. (2011) Platelet ligands and ADAMTS13 during Puumala hantavirus infection and associated thrombocytopenia. *Blood Coagul Fibrinolysis* 22: 468–472.
34. Laine O, Mäkelä S, Mustonen J, Huhtala H, Szanto T, et al. (2010) Enhanced thrombin formation and fibrinolysis during acute Puumala hantavirus infection. *Thromb Res* 126: 154–158.
35. Sane J, Laine O, Mäkelä S, Paakkala A, Jarva H, et al. (2012) Complement activation in Puumala hantavirus infection correlates with disease severity. *Ann Med* 44: 468–475.
36. Mäkelä S, Mustonen J, Ala-Houhala I, Hurme M, Koivisto AM, et al. (2004) Urinary excretion of interleukin-6 correlates with proteinuria in acute Puumala hantavirus-induced nephritis. *Am J Kidney Dis* 43: 809–816.

37. Schrocksnadel K, Wirleitner B, Winkler C, Fuchs D (2006) Monitoring tryptophan metabolism in chronic immune activation. *Clin Chim Acta* 364: 82–90.
38. Laich A, Neurauter G, Widner B, Fuchs D (2002) More rapid method for simultaneous measurement of tryptophan and kynurenine by HPLC. *Clin Chem* 48: 579–581.
39. Eugen-Olsen J, Andersen O, Linneberg A, Ladelund S, Hansen TW, et al. (2010) Circulating soluble urokinase plasminogen activator receptor predicts cancer, cardiovascular disease, diabetes and mortality in the general population. *J Intern Med* 268: 296–308.
40. Ostrowski SR, Katzenstein TL, Piironen T, Gerstoft J, Pedersen BK, et al. (2004) Soluble urokinase receptor levels in plasma during 5 years of highly active antiretroviral therapy in HIV-1-infected patients. *J Acquir Immune Defic Syndr* 35: 337–342.
41. Ostrowski SR, Piironen T, Hoyer-Hansen G, Gerstoft J, Pedersen BK, et al. (2005) High plasma levels of intact and cleaved soluble urokinase receptor reflect immune activation and are independent predictors of mortality in HIV-1-infected patients. *J Acquir Immune Defic Syndr* 39: 23–31.
42. Yilmaz G, Mentese A, Kaya S, Uzun A, Karahan SC, et al. (2011) The diagnostic and prognostic significance of soluble urokinase plasminogen activator receptor in Crimean-Congo hemorrhagic fever. *J Clin Virol* 50: 209–211.
43. Ostergaard C, Benfield T, Lundgren JD, Eugen-Olsen J (2004) Soluble urokinase receptor is elevated in cerebrospinal fluid from patients with purulent meningitis and is associated with fatal outcome. *Scand J Infect Dis* 36: 14–19.
44. Garcia-Monco JC, Coleman JL, Benach JL (2002) Soluble urokinase receptor (uPAR, CD 87) is present in serum and cerebrospinal fluid in patients with neurologic diseases. *J Neuroimmunol* 129: 216–223.
45. Berres ML, Schlosser B, Berg T, Trautwein C, Wasmuth HE (2012) Soluble urokinase plasminogen activator receptor is associated with progressive liver fibrosis in hepatitis C infection. *J Clin Gastroenterol* 46: 334–338.
46. Andersen ES, Ruhwald M, Moessner B, Christensen PB, Andersen O, et al. (2011) Twelve potential fibrosis markers to differentiate mild liver fibrosis from cirrhosis in patients infected with chronic hepatitis C genotype 1. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 30: 761–766.
47. Mackow ER, Gavrilovskaya IN (2009) Hantavirus regulation of endothelial cell functions. *Thromb Haemost* 102: 1030–1041.

10 KIRJALLISUUSKATSAUS

10.1 Mikä on suPAR?

Urokinaasityyppisen plasminogeeniaktivaattorin reseptori (urokinase type plasminogen activator receptor, uPAR) ja erityisesti sen liukoinen muoto (soluble urokinase type plasminogen activator receptor, suPAR) ovat olleet vilkkaan tutkimuksen kohteena viime vuosina. suPAR:n merkitys ennusteellisena tekijä muun muassa erilaisissa infektioissa on ollut monen tutkijan mielenkiinnon kohteena. Siitä on toivottu hyvää kliinistä biomarkkeria eri tautitiloissa esimerkiksi yleisesti käytetyn CRP:n rinnalle.

uPAR on solukalvon glykoproteiini, jota esiintyy kiinnittyneenä useiden solutyypin, kuten monosyyttien, aktivoituneiden T-solujen, makrofagien ja endoteelisolujen pinnalla (Thuno ym. 2009). uPAR toimii solukalvolla monenlaisissa signaalintehävissä, jotka liittyvät solujen migraatioon, adheesioon, erilaistumiseen ja proliferaatioon. uPAR:n pääasiallinen ligandi on urokinaasityyppinen plasminogeeniaktivaattori (uPA). uPA-ligandin sitouduttua uPAR:iin, uPAR:n proteaasi aktivoituu ja irrottaa uPAR:n solukalvosta, jolloin muodostuu liukoisessa muodossa oleva suPAR. (Ossowski & Aguirre-Ghiso 2000, Blasi & Carmeliet 2002.)

suPAR:n pitoisuus plasmassa, virtsassa, seerumissa ja selkäydinnesteessä nousee immunologisen järjestelmän aktivoitumisen yhteydessä. Inflammaation ja infektioiden lisäksi plasman suPAR-pitoisuus kasvaa myös erilaisissa syöpäsairauksissa. (Thuno ym. 2009.) Sen korkea pitoisuus ennustaa väestötasolla myös mm. tyypin II diabetesta sekä sydän- ja verisuonisairauksia (Eugen-Olsen ym. 2010). suPAR toimii kemotaktisena molekyylinä, joka houkuttelee paikalle immuunijärjestelmän soluja (Thuno ym. 2009). suPAR:lla arvellaan olevan muitakin tehtäviä ja vaikutuksia, joita edelleen tutkitaan. Tutkimusten mukaan sillä saattaa olla osuutta joidenkin tautien, kuten fokaalisen segmentaalisen glomeruloskleroosin (FSGS), patogeneesissa (Wei ym. 2011).

10.2 suPAR sairauksien patogeneesissa

Wei työryhmineen tutki suPAR:a fokaalisen segmentaalisen glomeruloskleroosin (FSGS) patogeneesissa. FSGS on proteinuriaa aiheuttava munuaissairaus, jota esiintyy myös siirrettyissä munuaisissa. Geneettisten tekijöiden ohella on arveltu, että taudin patogeneesiin liittyy muitakin tekijöitä, kuten verenkierrossa esiintyvät molekyylit. Jo aiemmin on tiedetty, että solukalvoon kiinnittynyt uPAR voi kiinnittyä $\beta 3$ -integriineihin, mutta tutkijat havaitsivat, että myös liukoinen suPAR voi sitoutua $\beta 3$ -integriineihin. Tämä edelleen aiheuttaa munuaiskapillaarien podosyyttien toiminnan häiriintymistä ja proteinuriaa. Tutkijat havaitsivat, että suPAR-pitoisuus oli merkittävästi korkeampi kahdella kolmasosalla FSGS:tä sairastavista kuin terveillä verrokeilla. He myös havaitsivat, että vähentämällä plasman suPAR-pitoisuutta merkittävästi plasmafereesin avulla, tutkituilla FSGS:tä sairastavilla potilailla tauti saavutti remission. Tutkimustulosten perusteella tutkijat päättelivät, että suPAR on mahdollisesti yksi tekijä FSGS:n patogeneettisessä mekanismissa. (Wei ym. 2011.)

10.3 suPAR-pitoisuus ennusteellisena tekijänä infektioiden yhteydessä

1.3.1 suPAR ennustetekijänä sepsiksessä

Mölkänen tutkimusryhmineen selvitti prospektiivisessa kohorttitutkimuksessaan suPAR-pitoisuuksia potilailla, joilla oli todettu *Staphylococcus aureus* -bakteremia. Tutkimuksen tavoitteena oli tutkia ja arvioida suPAR-pitoisuuden yhteyttä syviin infektiotokuksiin sekä kuolleisuuteen kuukauden seuranta-aikana. Yhteensä 59 potilasta osallistui tutkimukseen. Tutkimuskohortti jaettiin kolmeen ryhmään: niihin (n = 25), joilla oli syvä infektiotokus, potilaisiin (n = 15), joilla ei ollut syvää infektiotokusta ja niihin, jotka menehtyivät (n = 19) kuukauden seuranta-aikana. Infektioon menehtyneillä oli merkittävästi korkeammat suPAR-pitoisuudet kuin selviytyneillä (12,3 ng/ml vs. 8,4 ng/ml, p = 0,002). suPAR-pitoisuuksien ero menehtyneiden ja selviytyneiden välillä säilyi kymmenenteen seurantapäivään asti. Niillä, joilla oli todettu syvä infektiotokus ei todettu merkitsevää eroa suPAR-pitoisuuksissa verrattuna niihin, joilla syvää infektiotokusta ei ollut. suPAR-pitoisuuden raja-arvolla 9,25

ng/ml oli 79 %:n herkkyys ja 68 %:n tarkkuus kuolleisuuden ennustajana. Tutkimuksessa määritettiin myös CRP-pitoisuuden merkitys kuolleisuuden ennustajana, mutta kuolleisuuden ja CRP-pitoisuuden välillä ei todettu olevan suPAR:n kaltaista yhteyttä. Tutkijat pitivät suPAR:a lupaavana merkkiaineena, joka ennustaa kuolleisuutta *Staphylococcus aureuksen* aiheuttamissa sepsiksissä. suPAR:n suhteen tutkijat pitivät erityisenä etuna sitä, että suPAR ennustaa kuolleisuutta usean päivän aikana, eikä näin ollen ole riippuvainen tietystä näytteenottoajankohdasta. (Mölkänen ym. 2011.)

Uusitalo-Seppälä työryhmineen tutki plasman suPAR-pitoisuutta varhaisena ennustamerkinä infektioepäilypotilailla. Tutkimuksessa määritettiin suPAR-pitoisuudet 539:n päivystyspoliklinikalle tulleen potilaan plasmanäytteestä. Tutkimukseen osallistuneet potilaat jaettiin viiteen eri ryhmään. Ryhmä 1 koostui potilaista (n = 59) , joilla ei ollut bakteeri-infektiota tai yleistynyttä tulehdusreaktio-oireyhtymää (SIRS), ryhmän 2 (n = 68) potilailla oli bakteeri-infektio, mutta ei SIRS:iä, ryhmän 3 muodostivat potilaat (n = 54), joilla oli SIRS, muttei bakteeri-infektiota ja ryhmän 4 muodostivat potilaat (n = 309), joilla puolestaan oli todettu sepsis, mutta ei elinvauriota. Ryhmässä 5 potilailla (n = 49) oli sepsis ja elinvaurio eli kyseisen ryhmän potilailla oli vaikea sepsis. Tutkimuksessa havaittiin, että suPAR-pitoisuudet olivat merkittävästi korkeammat niillä, jotka menehtyivät (8,3 ng/ml) kuin niillä jotka selvisivät infektiosta (4,9 ng/ml, $p < 0,001$). Tulosten perusteella tutkijat pitivät suPAR:a riippumattomana vakavan sepsiksen ja kuolleisuuden ennustajana ja mikä tärkeintä, mahdollisesti myös kliinisesti käyttökelpoisena. (Uusitalo- Seppälä ym. 2012) Myös Raggam ym. (2014) tutkivat suPAR:a varhaisena prognostisena tekijänä SIRS:n yhteydessä. Varsin suuren tutkimuskohortin muodosti 902 potilasta, jolla oli todettu SIRS. suPAR:a verrattiin tautiennustajana CRP-, PCT- ja IL-6 -pitoisuuksiin. Vertailussa suPAR oli paras 48 tunnin sekä 30:n ja 90:n vuorokauden kuolleisuutta ennustava tekijä.

Samankaltaisiin tuloksiin päädyttiin myös tutkimuksessa, jossa tutkittiin plasman suPAR-pitoisuutta 132 potilaalta, joilla oli todettu *Staphylococcus aureuksen*, *Streptococcus pneumoniaen*, β -hemolyyttisen streptokokin tai *E. Colin* aiheuttama bakteremia. suPAR-pitoisuudet määritettiin plasmanäytteistä, jotka oli otettu 1–4 päivää positiivisen veriviljelylöydöksen jälkeen, 13–18 seuranta-päivän kohdalla sekä toipumisvaiheessa (> 26 päivää). 30 päivän seuranta-aikana 18 potilaista kuoli. suPAR-pitoisuudet taudin alkupäivinä (1–4 päivää) olivat merkittävästi suuremmat niillä, jotka menehtyivät (mediaani 15,8 ng/ml)

kuin niillä jotka selvisivät (mediaani 7,3 ng/ml, $p < 0,001$). Raja-arvolla 11,0 ng/ml oli 83% herkkyys ja 76 % tarkkuus kuolleisuuden ennustajana. Korkeaan suPAR-pitoisuuteen ($> 11,0$ ng/ml) liittyi myös enemmän vaikean taudin kliinisiä ilmentymiä, kuten hypotensiota ja elinvaurioita. Kun mahdollisten sekoittavien tekijöiden osuus suljettiin pois, tutkijoiden mukaan korkea suPAR-pitoisuus oli itsenäinen kuolleisuutta ennustava yleisimpien bakteremioiden yhteydessä. (Huttunen ym. 2011.)

Kreikkalaisessa prospektiivisessä kohorttitutkimuksessa tutkittiin suPAR-pitoisuutta ennustetekijänä hengityslaittehoitoon liittyvän pneumonian ja siitä seuranneen sepsiksen yhteydessä. Tutkimuksessa tutkittiin yhteensä 180 sepsispotilaan plasmanäytteet. Kontrolleina toimivat 50 potilasta, joilla oli kriteerien mukaan SIRS, sekä 10 tervettä vapaaehtoista. Plasmanäytteiden suPAR-pitoisuudet tutkittiin seitsemän peräkkäisen päivän näytteistä. Tutkimuksen 180 sepsispotilaasta 47 potilaalla oli sepsis, 49:llä oli vaikea sepsis ja 84:llä oli kriteerien mukaan septinen sokki. 28 päivän seuranta-aikana 50 potilaista menehtyi. suPAR-pitoisuudet olivat sitä korkeampia mitä vaikeammasta taudista oli kyse. Kautta seuranta-ajan suPAR-pitoisuudet olivat korkeammat niillä potilailla, jotka menehtyivät infektion seurauksena kuin niillä, jotka selvisivät infektiosta. Raja-arvoa 10,5 ng/ml suuremmilla suPAR-pitoisuuksilla oli 80 %:n spesifisyys ja 77,6 %:n positiivinen ennustearvo erottaa sepsis vaikeasta sepsiksestä. Raja-arvoa 12,9 ng/ml suuremmilla suPAR-pitoisuuksilla oli 80 %:n spesifisyys sekä 76,1 %:n positiivinen ennustearvo kuolleisuuden ennustajana. Tulosten perusteella tutkijat pitivät suPAR:a luotettavana sepsiksen vaikeusasteen arvioinnissa sekä suurempina pitoisuuksina vahvana kuolleisuuden ennustajana. (Savva ym. 2011.)

Eräässä tutkimuksessa vertailtiin plasman inflammatorisia biomarkkereita diagnostisina ja prognostisina tekijöinä SIRS-potilalla. Vertailussa olivat suPAR:n ohella mukana mm. CRP, PCT, IL-6, IL-8, kystatiini-C, kreatiniini, biotiini, seerumin amyloidi sekä fibronektiini. 159 potilaasta 110:llä oli joko *Staph. Aureuksen*, *E. Colin* tai *Candida albicansin* aiheuttama bakteremia. Diagnostisena markkerina sepsiksen suhteen PCT toimi parhaiten (AUC 0,694, 95% CI 0,607 – 0,781), mutta suPAR oli paras itsenäinen 30 päivän tautikuolleisuutta ennustavana tekijä (AUC 0,676, 95% CI 0,572 – 0,781). Eri biomarkkereita yhdistämällä paras prognostinen yhdistelmä oli kuitenkin seerumin amyloidin ja biotiinin yhdistelmä (AUC 0,679 95% CI 0,567 – 0,791). (Reichsoellner ym. 2014.)

10.3.2 suPAR ennustetekijänä tuberkuloosi-infektiossa

Eräässä tutkimuksessa tutkittiin, voiko plasman suPAR-pitoisuutta tai pikemminkin sen muutosta käyttää hoidon tehon arvioinnissa tai kuolleisuuden ennustajana *Mycobacterium tuberculosis* (TB) -infektion hoidon aikana. Jo aiemmin tutkimuksissa on osoitettu, että suPAR-pitoisuus on koholla potilailla, joilla on aktiivinen TB-infektio, ja pitoisuus laskee hoidon onnistumisen myötä. Lisäksi on todettu, että korkea suPAR-pitoisuus ennustaa suurempaa kuolleisuuden riskiä (Eugen-Olsen ym. 2002). Rabna ym. (2011) tutkivat prospektiivisessä kohorttitutkimuksessaan 278:n aktiivista keuhkotuberkuloosia sairastavan potilaan plasmanäytteistä suPAR-pitoisuutta TB:n diagnoosivaiheessa sekä seuranta-aikana 2 viikon sekä 1, 2, 5 ja 8 kuukauden kohdalla hoidon aloituksesta. Potilaat jaettiin eri neljänneksiin diagnoosivaiheessa mitatun suPAR-pitoisuuden perusteella. Korkeimman neljänneksen potilailla ($n = 70$), joilla suPAR-pitoisuus oli yli 8,4 ng/ml, oli selkeästi korkeampi kuolleisuus (23 %) kuin muilla neljänneksillä yhteensä (7%) ($p = 0,004$). Riski menehtyä TB-infektion seurauksena seuranta-aikana (MRR, mortality risk ratio) niillä potilailla, joilla suPAR-pitoisuus nousi diagnoosivaiheen mittauksesta yhden kuukauden kohdalla hoidon aloituksesta, oli 4,5-kertainen (95%CI 1,45 – 14,1) ja niillä, joilla suPAR-pitoisuus nousi 2 kk:n kohdalla, oli 2,1-kertainen (95% CI 0,62 – 6,82). Tulosten perusteella tutkijoiden mukaan voitiin todeta, että korkea suPAR-pitoisuus hoidon aloitushetkellä sekä suPAR-pitoisuuden nousu yksi kuukausi hoidon aloituksen jälkeen, lisäävät kuolleisuuden riskiä TB-infektion hoidon aikana.

10.3.3 suPAR ennustetekijänä virusinfektioissa

uPAR:n ilmentyminen leukosyyttien pinnalla on lisääntynyt HIV-1-infektion yhteydessä. Eräässä tutkimuksessa selvitettiin, onko uPAR:n lisääntynyt ilmentyminen yhteydessä korkeampaan suPAR-pitoisuuteen plasmassa ja onko suPAR-pitoisuudella yhteys HIV-1-infektioon sairastuneen ennusteeseen. suPAR-pitoisuus määritettiin 314:n HIV-1-infektioon sairastuneen plasmasta ja potilaat jaettiin kahteen yhtä suureen ryhmään suPAR-pitoisuuden mediaanin (3,69 ng/ml) mukaan. Potilailla, joilla oli suuri suPAR-pitoisuus, oli suurempi

virustaakka, vähemmän CD4-soluja ja ko. ryhmässä esiintyi enemmän AIDS-kuolemia kuin matalan suPAR-pitoisuuden ryhmässä ($p < 0,001$ kaikissa). Tutkimuksessa havaittiin, että korkea plasman suPAR-pitoisuus liittyy selkeästi huonompaan tautiennusteeseen. (Sidenius ym. 2000) Samanlaiseen tulokseen päätyi Ostrowski tutkimusryhmineen. Tutkimuksessa mitattiin plasmasta intaktin suPAR:n lisäksi suPAR:n pilkkoutuneita muotoja. Tutkimustulos oli kuitenkin samankaltainen. Myös he totesivat, että suPAR-pitoisuus on itsenäinen kuolleisuutta ennustava tekijä HIV-1-infektioon sairastuneilla. (Ostrowski ym. 2005.)

Guinea-Bissaussa antiviraalista hoitoa ei ole saatavilla kaikille HIV-1-infektota sairastaville. Tutkijat yrittivät selvittää, onko olemassa ennustetekijöitä, joiden perusteella voisi arvioida, kenelle antiviraalinen hoito ensisijaisesti pitäisi suunnata. Tutkimuksessa todettiin, että korkea suPAR-pitoisuus ($> 5,3$ ng/ml) on HIV-1-infektion huonon ennusteen itsenäinen ennustetekijä. Tutkijat pitivätkin HIV-1-infektiota sairastavan suPAR-pitoisuutta yhtenä mahdollisena tekijänä, jonka avulla antiviraalinen hoito voitaisi suunnata sitä ensisijaisesti tarvitseville. (Oliveira ym. 2012.)

Yilmaz ym. (2010) tutkivat suPAR:n diagnostista ja ennusteellista arvoa eksoottisen Crimean-Kongo –verenvuotokuumeen (CCHF) yhteydessä. CCHF on Bunyaviridea-sukuun kuuluvan viruksen aiheuttama verenvuotokuume, joka tarttuu punkkien pureman välityksellä. Taudinkuva vaihtelee lievästä kuumetaudista fataaliin verenvuotokuumeeseen. Tässä retrospektiivisessä tutkimuksessa suPAR-pitoisuudet määritettiin sadan CCHF-potilaan ja 53:n terveen verrokin plasmanäytteistä. suPAR-pitoisuudet olivat merkittävästi korkeammat CCHF-potilailla kuin terveillä verrokeilla (6,2 ng/ml vs. 2,3 ng/ml, $p < 0,0001$). Hemorragiseen verenvuotokuumeeseen sopien suPAR-pitoisuus oli kääntäen verrannollinen trombosyyttien lukumäärään ($p < 0,001$), kun taas tilastollisesti merkittäviä positiivia korrelaatioita havaittiin mm. valkosolulukumäärän, kreatiniinin ja CRP:n välillä. Viisi potilaista kuoli seuranta-aikana. suPAR-pitoisuus oli merkittävästi korkeampi (18,4 ng/ml) niillä, jotka menehtyivät verrattuna niihin, jotka selviytyivät (5,6 ng/ml, $p = 0,034$). Kuolleisuuden ennustajana suPAR-pitoisuuksilla yli raja-arvon 10,6 ng/ml oli 100% sensitiivisyys ja 96 % tarkkuus. Tutkijat totesivat, että suPAR:lla on merkitystä kuolleisuutta ennustavana tekijänä CCHF:n yhteydessä ja suPAR saattaa tulevaisuudessa tarjota klinikolle kätevän työkalun erottaa jo alkuvaiheessa vaikea tautimuoto lievästä, joka edelleen tarjoaa mahdollisuuden antaa tehokasta hoitoa ja tehovalvontasoista hoitoa jo alkuvaiheessa sitä todennäköisemmin tarvitsevalle.

10.4 Yhteenveto

Useiden tutkimusten mukaan suPAR:lla on merkitystä erityisesti ennusteellisena tekijänä. Vertailussa muihin markkereihin, kuten yleisesti käytettyyn CRP:iin ja prokalsitoniiniin, suPAR on osoittanut paremmuutensa tautien prognostisena biomarkerina. Tutkimuksissa osoitettiin, että korkeat suPAR-pitoisuudet ennustavat hyvin kuolleisuutta sekä lyhyellä että pitkällä aikavälillä. Lisäksi suPAR-pitoisuus nousee inflammatorissa tiloissa jo varhaisessa vaiheessa ja pysyy melko stabiilina usean päivän ajan. Tämä parantaa sen kliinistä käytettävyyttä.

Oma tutkimuksemme osoitti, että myyräkuumetta sairastavilla korkea suPAR-pitoisuus on yhteydessä vaikeampaan taudinkuvaan. Myyräkuume johtaa erittäin harvoin kuolemaan, mutta osa sairastuneista joutuu dialyysi- tai tehohoitoon taudin akuutin vaiheen aikana ja joillekin taudista jää pysyviä haittoja, kuten aivolisäkkeen tai muun hormonitoiminnan häiriöitä. Myyräkuumeeseen ei ole saatavilla spesifistä hoitoa ja elintoimintoja tukeva hoito on ensisijaista. suPAR:in kaltaisen prognostisen biomarkerin avulla voisi jo varhaisessa vaiheessa erottaa sairastuneista ne, joilla taudinkuva tulee olemaan vaikeampi ja valikoida ne, jotka ovat intensiivisemmän hoidon tarpeessa.

On mahdollista, että suPAR on mukana myös myyräkuumeen patogeneettisessä mekanismissa. suPAR:n osallisuudesta patogeneesiin on saatu viitteitä muissakin proteinuriaa aiheuttavissa sairauksissa, mutta tutkimukset suPAR:n osuudesta eri sairauksien patogeneesissä ovat edelleen kesken. Nähtäväksi jää, voiko tulevaisuudessa esimerkiksi erilaisilla interventioilla pienentää suPAR-pitoisuutta, jotta tautien, joissa suPAR:lla saattaa olla osuus patogeneesissä, vakavimmat muodot olisi estettävissä.

Suomessa suPAR-pitoisuuden määrittäminen ei ole vielä saanut jalansijaa tavallisesti käytettyjen biomarkkereiden rinnalla. Nähtäväksi jää, nouseeko suPAR tulevaisuudessa käytetyksi infektiosairauksien ja mahdollisesti muidenkin sairauksien biomarkeriksi.

10.5 Lähteet

Blasi F, Carmeliet P. uPAR: a versatile signaling orchestrator. *Nature reviews molecular cell biology*. 2002;3:932–943.

Eugen-Olsen J, Andersen O, Linneberg A ym. Circulating soluble urokinase plasminogen activator receptor predicts cancer, cardiovascular disease, diabetes and mortality in the general population. *Journal of Internal Medicine*. 2010;268(3):296–308.

Eugen-Olsen J, Gustafson P, Sidenius N ym. The serum level of soluble urokinase receptor is elevated in tuberculosis patients and predicts mortality during treatment: a community study from Guinea-Bissau. *International Journal of Tuberculosis and Lung Diseases*. 2002;6(8):686–692.

Huttunen R, Syrjänen J, Vuento R ym. Plasma level of soluble urokinase-type plasminogen activator receptor as a predictor of disease severity and case fatality in patients with bacteremia: a prospective cohort study. *Journal of Internal Medicine*. 2011;270:32–40.

Mölkänen T, Ruotsalainen E, Thorball C.W, Järvinen A. Elevated soluble urokinase plasminogen activator receptor (suPAR) predicts mortality in *Staphylococcus aureus* bacteremia. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*. 2011;30:1417–1424.

Oliveira I, Andersen A, Furtado A ym. Assessment of simple risk markers for early mortality among HIV-infected patients in Guinea-Bissau: a cohort study. *BMJ Open (Electronic resource)* 2012;2(6):e001587

Ossowski L, Aguirre-Ghiso JA. Urokinase receptor and integrin partnership: coordination of signaling for cell adhesion, migration and growth. *Current Opinion in Cell Biology*. 2000;12(5):613–620.

Ostrowski S, Piironen T, Hoyer-Hansen G ym. High plasma levels of intact and cleaved soluble urokinase receptor reflect immune activation and are independent predictors of mortality in HIV-1-infected patients. *Journal of Acquired Immune Deficiency syndromes*. 2005;39:23–31.
Rabna P, Andersen A, Wejse C ym. Utility of the plasma level of suPAR in monitoring risk of mortality during TB treatment. *PLoS ONE (Electronic resource)* 2012;7(8):e43933.

Raggam R.B, Wagner F, Prüller F ym. Soluble urokinase plasminogen activator receptor predicts mortality in patients with systemic inflammatory response syndrome. *Journal of Internal Medicine*. 2014;276:651–658.

Reichsoellner M, Raggam R. B, Wagner J ym. Clinical evaluation of multiple inflammation biomarkers for diagnosis and prognosis for patients with systemic inflammatory response syndrome. *Journal of Clinical Microbiology*. 2014;52(11):4063–4066.

Savva A, Raftogiannis M, Baziaka F ym. Soluble urokinase plasminogen activator receptor (suPAR) for assessment of disease severity in ventilator-associated pneumonia and sepsis. *Journal of Infection*. 2011;63:344–350.

Sidenius N, Sier C, Ullum H ym. Serum level of soluble urokinase-type plasminogen activator receptor is a strong and independent predictor of survival in human immunodeficiency virus infection. *Blood*. 2000;96:4091–4095.

Thuno M, Macho B & Eugen-Olsen J. suPAR: the molecular crystal ball. *Disease Markers*. 2009;27:157–172.

Uusitalo-Seppänen, Huttunen R, Tarkka M ym. Soluble urokinase-type plasminogen activator in patients with suspected infection in the emergency room: a prospective cohort study. *Journal of Internal Medicine*. 2012;272:247–256.

Wei C, El Hindi S, Li J ym. Circulating urokinase receptor as a cause of focal segmental glomerulosclerosis. *Nature Medicine*. 2011;17(8):952–560.

Yilmaz G, Mentese A, Selcuk K ym. The diagnostic and prognostic significance of soluble urokinase plasminogen activator receptor in Crimean-Congo hemorrhagic fever. *Journal of Clinical Virology*. 2011;50:209–211.